

PRODUCTION OF BETA-MANNOSYLOLIGOSACCHARIDE

Patent number: JP8009989
Publication date: 1996-01-16
Inventor: FUJIMOTO HIROSHI; AJISAKA KATSUMI
Applicant: MEIJI MILK PROD CO LTD
Classification:
- international: C12P19/14; C07H1/00
- european:
Application number: JP19940173151 19940704
Priority number(s): JP19940173151 19940704

Report a data error here

Abstract of JP8009989

PURPOSE: To obtain a beta-1,4-mannooligosaccharide such as beta-1,4-mannobiose, beta-1,4-mannotriose, beta-1,4-mannotetraose or a methyl beta-mannoside useful as a synthetic raw material for biochemical reagents or medicines. **CONSTITUTION:** This method for producing various beta-mannosyloligosaccharides is to carry out the enzymic reaction in an aqueous solution containing mannose or a manooligosaccharide or a mannose derivative and a saccharide or an alcohol with a beta-mannosidase or a beta-mannanase.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-9989

(43)公開日 平成8年(1996)1月16日

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 P 19/14

C 0 7 H 1/00

識別記号

庁内整理番号

Z 7432-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平6-173151

(22)出願日 平成6年(1994)7月4日

(71)出願人 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(72)発明者 藤 本 浩

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(72)発明者 鯨 坂 勝 美

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(74)代理人 弁理士 戸田 親男

(54)【発明の名称】 β -マンノシルオリゴ糖の製造方法

(57)【要約】

【構成】 本発明は、マンノース又はマンノオリゴ糖又はマンノース誘導体と、糖又はアルコールとを含有する水性液で、 β -マンノシダーゼ又は β -マンナナーゼによる酵素反応を行なわしめて、各種 β -マンノオリゴ糖をの製造する方法である。

【効果】 本発明の製造方法によって得られる化合物は、 β -1, 4マンノピオース、 β -1, 4マンノトリオース、 β -1, 4マンノテトラオース、メチル β -マンノシドなどの β -1, 4マンノオリゴ糖及びその関連化合物に及ぶが、これら化合物は生化学的試薬や医薬の合成原料として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マンノース又はマンノオリゴ糖又はマンノース誘導体と、糖又はアルコールとを含有する水性液で、 β -マンノシダーゼ又は β -マンナナーゼによる酵素反応を行なわしめることを特徴とする β -マンノオリゴ糖の製造方法。

【請求項2】 酵素反応が縮合反応であることを特徴とする請求項1の β -マンノオリゴ糖の製造方法。

【請求項3】 酵素反応が転移反応であることを特徴とする請求項1の β -マンノオリゴ糖の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、 β -1, 4マンノオリゴ糖の酵素反応による製造方法に関するものである。本発明の製造方法によって得られる化合物は、 β -1, 4マンノビオース、 β -1, 4マンノトリオース、 β -1, 4マンノテトラオース、メチル β -マンノシドなどの β -1, 4マンノオリゴ糖及びその関連化合物に及ぶが、これら化合物は生化学的試薬や医薬の合成原料として有用である。

【0002】

【従来の技術および問題点】 ヒト糖タンパク質糖鎖の重要な部分構造にはD-マンノースが β -1, 4グリコシド結合した化合物である β -1, 4マンノオリゴ糖が含まれている。さらに近年では糖鎖の持つ生理機能が注目されており、医薬品の原料としての応用が期待されている。また、 β -1, 4マンノオリゴ糖はビフィズス菌の増殖物質（特開58-212780）としても知られている。

【0003】 β -1, 4マンノオリゴ糖は、例えばマンナンを酵素または酸で部分的に加水分解することによって得られる。しかし、酵素や酸による加水分解法ではオリゴ糖画分を優先的に得ることは難しく、また原料であるマンナンは水溶性が低く工業的な規模での加水分解は困難である。さらに、天然のマンナンには β -1, 4マンノースからなる主鎖にガラクトースなどの側鎖がついている場合もあり、その場合酵素分解がされにくく、ガラクトースなどの付加したオリゴ糖が副生してしまうという問題点がある。マンノースだけからなるオリゴ糖を効率よく得るには、ガラクトシダーゼなどの酵素により側鎖を取り除くことが必要となる。この様に、マンナンを原料にした加水分解法では操作が煩雑になるばかりか原料であるマンナンも回収できないなどの問題点がある。また、有用な β -マンノオリゴ糖を選択的に化学合成することは困難である。したがって、これら糖類や医薬品の原料となる β -マンノオリゴ糖の工業的規模での合成法の開発が望まれていた。

【0004】

【問題点を解決するための手段】 本発明者らは、上記の問題点を解決するために鋭意研究を重ねた結果、マンノ

ースを原料とし、 β -マンノシダーゼ又は β -マンナナーゼを用いる縮合反応又は転移反応によって各種 β -1, 4マンノオリゴ糖を選択的かつ簡便な方法で製造することに初めて成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は β -マンノースを非還元末端に持つオリゴ糖の製造方法に関する。

【0005】 以下に本発明の内容を更に詳細に説明する。本発明においては β -マンノシル結合を加水分解する酵素である β -マンノシダーゼ [EC 3. 2. 1. 25] あるいは β -マンナナーゼ [EC 3. 2. 1. 78] を用いることが出来る。酵素の起源としてはリゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*) あるいはアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが例示できる。また、簡易的には市販酵素を用いることが出来、バクチナーゼやヘミセルラーゼ製剤中に混在した β -マンノシダーゼあるいは β -マンナナーゼを利用することも可能である。

【0006】 反応は、マンノース又はマンノオリゴ糖又はマンノース誘導体と、糖又はアルコールとを含有する水性液で、 β -マンノシダーゼ又は β -マンナナーゼによる縮合反応又は転移反応によって行なわれる。

【0007】 マンノオリゴ糖としては、 β -1, 4マンノビオース、 β -1, 4マンノトリオース、 β -1, 4マンノテトラオースなどがあり、マンノース誘導体としてはp-ニトロフェニルマンノシド、o-ニトロフェニルマンノシド、マンノピラノシルフルオリドなどがあり、糖としてはN-アセチルグルコサミンなどがあり、アルコールとしてはメタノールなどがある。

【0008】 縮合反応において原料としてマンノースを用いた場合、 β -1, 4マンノビオースおよびマンノトリオースが生成する。通常は高濃度の糖溶液に酵素を加えて反応を行うが、固定化酵素と活性炭とをそれぞれ詰めたカラムを直列につなぎ、高濃度の糖溶液を循環させるカラム法（特願62-315349）を用いてもよい。未反応の原料であるマンノースは回収して再度反応に用いることが出来ることが本発明の長所である。また、原料としてマンノースとN-アセチルグルコサミンを用いれば、糖タンパク質糖鎖の重要な部分構造であるMan β 1, 4GlcNAcなどのヘテロなマンノオリゴ糖を合成することも可能である。

【0009】 さらに、本発明においては、p-ニトロフェニルマンノシド、o-ニトロフェニルマンノシド或いはマンノピラノシルフルオリド等のマンノース誘導体や、上記縮合反応で合成した各種 β -1, 4マンノオリゴ糖をマンノース供与体とした転移反応を行うことにより、ヘテロなマンノオリゴ糖を合成することも可能である。その場合マンノース受容体としては、マンノース、マンノオリゴ糖、マンノース誘導体、種々の糖、種々のアルコール類などのヒドロキシル基を持つ化合物を用いることができる。マンノース供与体とマンノース受容体

3

の量はモル比で1:0.5~1:5とする事が望ましい。

【0010】

【実施例】

【0011】

【製造例】リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*) 起源の粗酵素標品「スミチームMC」(商品名、新日本化学株式会社製) 10gを含む水溶液に硫酸を75%飽和になるように添加し、4℃で一晩放置した。生じた沈澱を遠心分離によって回収し、20mM、pH5の酢酸緩衝液に対して透析し、DEAE-セファロースカラムおよびセファクリルS-200カラムを用いて精製を行いβ-マンノシダーゼおよびβ-マンナーゼ活性を持つ画分を得た。

【0012】

【実施例1】マンノース35gを含む水溶液50mlに上記製造例で調整したβ-マンノシダーゼを2.5U添加し、37℃で3日間反応を行った。100℃、5分間沸騰水浴中で反応を停止後、この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、水にて原料のマンノースを溶出させた。次に、2および4%濃度のアセトニトリル水溶液によりオリゴ糖を溶出させた。それぞれの画分を凍結乾燥した結果β-1,4マンノビオースおよびβ-1,4マンノトリオースをそれぞれ162および65mg得た。活性炭カラムクロマトグラフィーからのオリゴ糖の溶出パターンおよびβ-1,4マンノビオースの¹³C-NMRを図1および2に示す。

【0013】

【実施例2】β-1,4マンノビオース500mgを含む水溶液10mlに上記製造例で調整したβ-マンノシダーゼを50mU添加し、37℃4時間反応を行った。100℃、5分間沸騰水浴中で反応を停止後、この反応

4

液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、0から10%濃度のアセトニトリルを含む水溶液の直線濃度勾配によりオリゴ糖を溶出させた。フェノール-硫酸法により検出した糖溶出画分を凍結乾燥した結果、β-1,4マンノトリオース、β-1,4マンノテトラオースおよびβ-1,4マンノヘキサオースをそれぞれ97、37および9mg得た。反応液のHPLCを図3に示す。

【0014】

【実施例3】β-1,4マンノビオース500mgおよびメタノール2.5mlを含む水溶液10mlに、上記例で調整したβ-マンノシダーゼを50mU添加し、37℃で10時間反応を行った。100℃、5分間沸騰水浴中で反応を停止後、この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、0から10%濃度のアセトニトリルを含む水溶液の直線濃度勾配によりオリゴ糖を溶出させた。薄層クロマトグラフィー(TLC)により検出した糖溶出画分を凍結乾燥した結果、メチルβ-マンノシドを42mg得た。反応液のHPLCおよび生成物の¹H-NMRを図4、5に示す。

【0015】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば有機化学的には合成が困難であるβ-1,4-マンノオリゴ糖を効率よくかつ工業的にも生産可能な方法で合成することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1におけるオリゴ糖の溶出パターンを示す。

【図2】マンノビオースの¹³C-NMRを示す。

【図3】実施例2における反応液のHPLCを示す。

【図4】実施例3における反応液のHPLCを示す。

【図5】メチルβ-マンノシドの¹H-NMRを示す。

【図1】

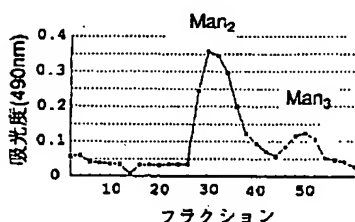


図1 活性炭カラムクロマトグラフィー
Man₂: mannobiose, Man₃: mannotriose

【図2】

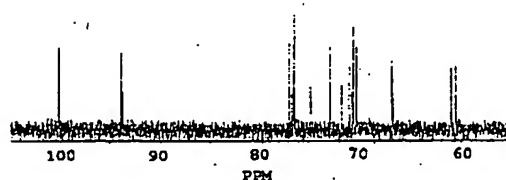


図2 マンノビオースの¹³C-NMR

BEST AVAILABLE COPY

【図3】

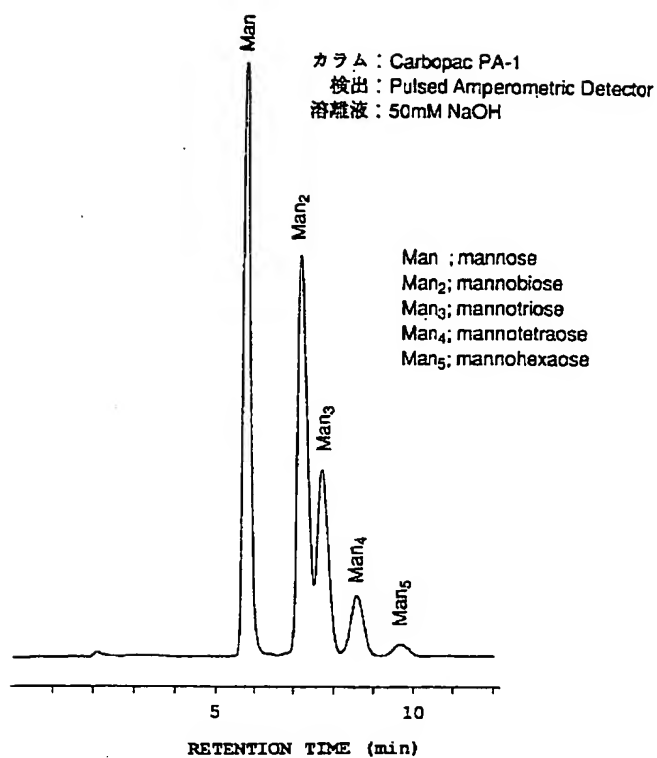


図3 マンノオリゴ糖のHPLC

【図4】

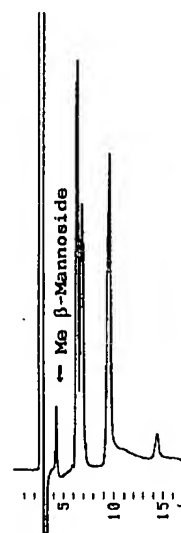
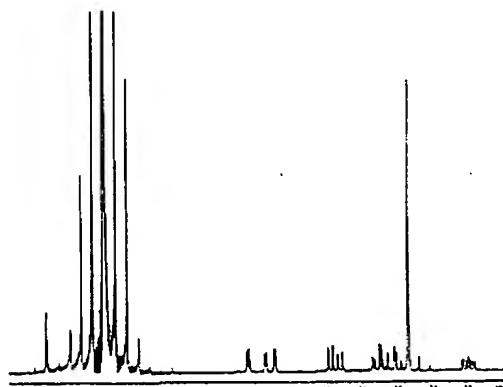


図4 メチルβ-マンノシドのHPLC

【図5】

図5 メチルβ-マンノシドの¹H-NMR

BEST AVAILABLE COPY